

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PF/EF 397 044 10
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

29720388

EP 92
4918



REC'D	01 SEP 1999
WIPO	PCT

Bescheinigung

Die Immundiagnostik GmbH in Bensheim/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Multifunktionelles Vitamin-D3-Konjugat"

am 25. Juni 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 C, C 07 D und G 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 17. August 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 28 379.2



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Wehner

Multifunktionelles 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Konjugat und
Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1,25-
Dihydroxy-Vitamin-D₃

5

Die Erfindung betrifft ein 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Derivat,
ein Verfahren zu seiner Herstellung sowie Verfahren zur
Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃ in
Seren.

10

Die europäischen Patentschriften 0 312 360 und 0 363 211
beschreiben verschiedene ¹²⁵Iod-markierte 1 α - oder 24R,25-Di-
hydroxy-Vitamin-D₃-Aminosäurederivate und deren Verwendung
in kompetitiven Bindungsstudien. Gegenüber ³²P- oder ³H-
markierten Derivaten besitzen die ¹²⁵I-markierten Vitamin-D₃-
Derivate eine höhere spezifische Aktivität, so dass die Be-
stimmungen genauer werden. Nachteilig an radioaktiven Deri-
vaten ist deren aufwendige Herstellung. Eine Markierung mit
¹²⁵I führt zudem häufig zu einer starken Veränderung der
dreidimensionalen Molekülstruktur, so dass sich die spezi-
fischen Bindungseigenschaften des Proteins verändert. Wei-
tere Nachteile einer radioaktiven Markierung sind die hohen
Kosten für Lagerung und Transport sowie für die Entsorgung
der Abfälle, abgesehen Gesundheits- und Umweltaspekten. Hin-
zu kommt die begrenzte Haltbarkeit der markierten Moleküle
wegen der Halbwertszeit, insbesondere die geringe Beständig-
keit in biologischen Proben wie Serum.

15

20

25

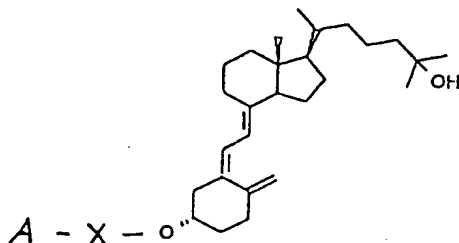
Ray et al. (Biochemistry, 1991, 30, 4809-4813) beschreiben
verschiedene farbstoffmarkierte 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Deri-
vate zur Markierung von Vitamin-D-Bindungsproteinen. Diese
Derivate sind nicht radioaktiv, aber auch nicht stabil, ins-
besondere nicht lichtstabil. Die Direkt-farbstoffmarkierten
Derivate eignen sich zwar für kompetitive Bindungsstudien,
sie bieten aber nur eine geringe Nachweisempfindlichkeit.

30

35

Es ist Aufgabe der Erfindung, ein haltbares stabiles Vitamin-D₃-Derivat zum Einsatz in kompetitiven Bestimmungsverfahren zur Verfügung zu stellen, das eine genauere Bestimmung der beiden Vitamin-D₃-Metabolite 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃ erlaubt und nicht die Nachteile der radioaktiven Derivate bietet. Es ist weiter Aufgabe der Erfindung ein verbessertes Verfahren zur Herstellung dieses Vitamin-D₃-Derivats zur Verfügung zu stellen.

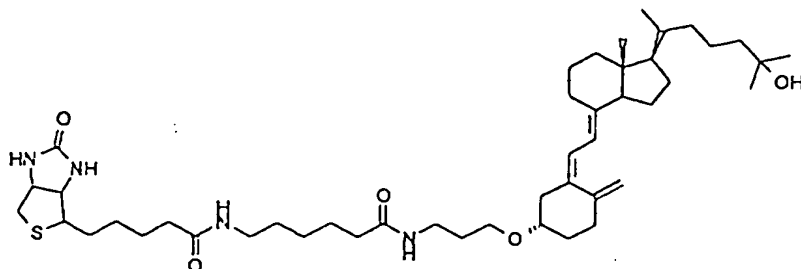
10 Diese Aufgabe wird gelöst durch ein multifunktionelles 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Derivat der allgemeinen Formel I: -

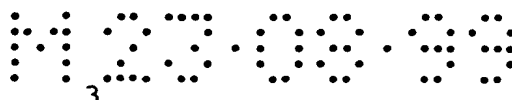


wobei X eine Abstandsgruppe ist, die eine Länge von 12 bis 42 Å hat und über eine Etherbindung mit der 25-OH-Gruppe des Vitamin-D₃-Moleküls verbunden ist, und A eine Gruppe ist, die von spezifischen Antikörpern mit hoher Affinität gebunden wird.

Hochaffine Antikörper-Antigen-Bindungen sind solche mit einer Dissoziationskonstante (K) größer als 10¹⁰, vorzugsweise größer als 10¹⁵.

Diese Aufgabe wird bevorzugt gelöst durch ein 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Derivat, wobei A eine Biotingruppe ist. Dieses Derivat entspricht der Formel II:





Das erfindungsgemäße 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Derivat der Formel II stellt eine stabile Verbindung mit zwei antigenen Epitopen bereit. Im Gegensatz zu herkömmlichen Vitamin-D₃-Derivaten, die an der 25-OH-Position eine Ester-Bindungen aufweisen, hat das erfindungsgemäße Vitamin-D₃-Derivat an dieser Position eine Ether-Bindung. Diese macht das Derivat beständig, insbesondere gegen den Angriff durch Esterasen, die im Serum ständig zugegen sind. Die hohe Lagerungsstabilität der erfindungsgemäßen Derivate ermöglicht ihren Einsatz in verschiedenen Bestimmungsverfahren für native 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃-Metabolite. Zudem ermöglichen diese Derivate nicht-radioaktive Nachweise und verursachen keine Probleme bei der Entsorgung.

Der Abstand zwischen den zwei Epitopen - der Bindungsstelle des Vitamin-D-Bindungsproteins und der Biotin-Gruppe - ist durch die Abstandsgruppe (Spacer) so gewählt, dass beide Epitope unabhängig voneinander frei zugänglich sind. Der Spacer ist bevorzugt ein Aminocarbonsäure-, ein Aminoundecansäure- oder ein Aminopolyetherrest und hat eine Länge von 12-42 Å, bevorzugt von 8 bis 12 Å.

Erfindungsgemäß wird die Verbindung der Formel II erhalten durch ein Verfahren mit folgenden Schritten:

- a) Cyanoethylierung von 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ mit Acrylnitril in Gegenwart von Kaliumhydrid;
- b) Reduktion der Nitrilgruppe mit LiH/LiAlH₄;
- c) Biotinylierung der Verbindung mit dem aktivierten Biotinylierungsreagenz (LC-BHNS).

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung der 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Biotin-Verbindung liefert eine hohe Ausbeute bei kurzer Reaktionsdauer. Dies wird erreicht durch die Auswahl geeigneter Reaktionsbedingungen und Schutzgruppen. In Schritt a) wird das 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ in Gegenwart von Kaliumhydrid umgesetzt. Durch diese Base wird das 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ selektiv an der 25-OH-Gruppe cyanoethyliert.

Die Reaktion erfolgt bei einer Temperatur von 6°C in neutralem Lösungsmittel.

5 Durch das ausgewählte Reduktionsverfahren in Schritt b) wird die Nitrilgruppe des Cyanoethylethers quantitativ zum Amin reduziert, so dass keine Produktgemische entstehen. Hierzu wird das Nitril zunächst mit LiH in sein Lithiumalkoholat überführt und dann mit LiAlH₄ zum Amin reduziert.

10 Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Herstellung der Zwischenprodukte in hoher Ausbeute. Diese können dann mit einem üblichen Biotinylierungsreagenz umgesetzt werden.

15 Weiterhin umfasst die Erfindung Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1,25-Hydroxy-Vitamin-D₃ in einer Probe, wobei das Vitamin-D₃-Derivat der Formel I verwendet wird.

20 Hierbei wird das erfindungsgemäße Vitamin-D₃-Konjugat eingesetzt, entweder als Zwischenglied, wobei Vitamin-D-Bindungsprotein und nativer Vitamin-D₃-Metabolit um die Bindungsstelle davon kompetitieren, oder selbst als kompetitive Bindungskomponente zu nativem Vitamin-D₃. Das Bestimmungsverfahren ist vorzugsweise ein ELISA, RIA oder IRMA.

25 Das bevorzugte Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃-Derivaten umfasst die Schritte: a) Beschichten des Trägers mit Streptavidin, b) Zugabe der Biotin-Vitamin-D₃-Derivate, c) Zugabe der Probe und einer definierten Menge Vitamin-D₃-Bindungsprotein, d) Bestimmung des gebundenen Bindungsproteins mit markierten anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörpern. Die anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörper sind bevorzugt mit Peroxidase markiert.

35 Ein weiteres bevorzugtes Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃-Derivaten umfasst die Schritte: a) Beschichten des Trägers mit anti-Vitamin-D-

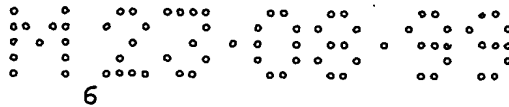
Bindungsprotein-Antikörpern, b) Zugabe des Vitamin-D₃-Bindungsproteins, c) Zugabe der Probe sowie eine definierte Menge Biotin-Vitamin-D₃-Derivat, d) Bestimmung der Menge gebundenen Derivat mit markiertem Streptavidin. Das Streptavidin ist bevorzugt mit Peroxidase markiert und der Träger ist vorzugsweise eine Mikrotiterplatte oder er besteht aus magnetischen Mikropartikeln.

Diese Verfahren ermöglichen einfache, nicht-radioaktive Routinebestimmungen für 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃, ohne dass aufwendige Sicherheitsvorkehrungen erforderlich sind oder Probleme bei der Entsorgung auftreten. Es wird zudem ein Testkit bereitgestellt zur Bestimmung von 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ in einer Probe, das auf dem erfindungsgemäßen Vitamin-D₃-Derivat beruht. Das Kit umfasst eine Mikrotiterplatte, das erfindungsgemäß biotinylierte Vitamin-D₃-Derivat, Vitamin-D-Bindungsprotein, anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörper sowie Streptavidin. Das Testkit kann als Trägermaterial auch Mikropartikel enthalten.

Das Kit stellt ein einfaches und verlässliches Bestimmungsverfahren für 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃ in biologischen Proben bereit, das routinemäßig eingesetzt werden kann. Durch die hohe Stabilität der Bestandteile läßt es sich gut lagern. Es treten auch keine Probleme bei der Entsorgung auf.

Es werden weitere Vorteile, Merkmale und Ausführungsformen der Erfindung anhand der nachstehenden Beispiele und mit Bezug auf die anliegenden Zeichnungen beschrieben. Es zeigt:

Fig. 1 eine schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Synthesewegs für 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3 β -3' [6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether);



Figs. 2, 3 und 4 Schemadarstellungen kompetitiver, nicht-radioaktiver ELISA-Verfahren für 25-Hydroxy- und 1,25-Hydroxy-Vitamin-D₃ mit 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3β-3' [6-N- (biotinyl) hexamido] amidopropylether);

5

Fig. 5 die Eichkurve eines kompetitiven, nicht-radioaktiven ELISA-Verfahrens für 25-Hydroxy- und 1,25-Hydroxy-Vitamin-D₃ aus Fig. 2;

10

Figs. 6 und 7 Schemadarstellungen kompetitiver RIA-Verfahren für 25-Hydroxy- und 1,25-Hydroxy-Vitamin-D₃ mit 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3β-3' [6-N- (biotinyl) hexamido] amidopropylether);

15

Figs. 8, 9 und 10 Schemadarstellungen kompetitiver, radioaktiver IRMA-Verfahren für 25-Hydroxy- und 1,25-Hydroxy-Vitamin-D₃ mit 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3β-3' [6-N- (biotinyl) hexamido] amidopropylether);

20

Figs. 11 und 12 Schemadarstellungen kompetitiver, nicht-radioaktiver ELISA-Verfahren gemäß der Erfindung unter Verwendung von Mikropartikeln;

25

Figur 1 zeigt das Syntheschema zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel II. Das erfindungsgemäße Vitamin-D₃-Konjugat der Formel II wird aus 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ über zwei Zwischenprodukte hergestellt.

30

Zunächst wird das 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ in Gegenwart von Kaliumhydrid in einem sauren Lösungsmittel mit Acrylnitril cyanoethyliert. Durch Verwenden von Kaliumhydrid als Base wird eine selektive Reaktion an der 25-OH-Gruppe erreicht und damit eine hohe Ausbeute Zwischenprodukt. Zudem erlaubt dieses Verfahren eine sehr kurze Reaktionsdauer von 40 Min.

35

Der gewonnene 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3β-cyanoethylether wird als erstes Zwischenprodukt aufgearbeitet. Im nächsten Reak-

tionsschritt wird dieses Produkt zunächst mit LiH versetzt, wodurch die 25-OH-Gruppe in das Lithiumalkoholat überführt wird. Anschließend erfolgt die Reduktion des Nitrils mit LiAlH₄ zum zweiten Zwischenprodukt 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3β-3'-aminopropylether. Auch dieses Zwischenprodukt kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren in hoher Ausbeute und ohne Entstehen undefinierte Nebenprodukte gewonnen werden.

Zuletzt erfolgt die Biotinylierungsreaktion mit dem aktivierten Biotinylierungsreagenz LC-BHNS (Biotinyl-N-ε-aminocaproyl-hydroxysuccinimidester). Dieses Biotinylierungsreagenz enthält als Abstandsgruppe eine Aminocaproylkette mit einer Länge von 8 bis 12 Å.

Das erfindungsgemäße 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Konjugat (25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3β-3' [6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether) ist temperaturstabil und kann in einer wässrigen, leicht sauren Matrix mehrere Monate gelagert werden. Sie eignet sich dadurch besonders für diagnostische Routine-tests und -kits.

Figur 2 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven, nicht-radioaktiven ELISA-Verfahrens für 25-Hydroxy- und 1,25-Hydroxy-Vitamin-D₃. Zunächst wird das 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Konjugat (25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3β-3' [6-N-(biotinyl)hexamido]amidopropylether) über Streptavidin an eine feste Phase gebunden. Dann erfolgt in flüssiger Phase die kompetitive Bindung von Vitamin-D-Bindungsprotein und 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ aus Standard oder Probe an das 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Konjugat. Der Nachweis erfolgt durch Peroxidase-markierte Antikörper gegen das Vitamin-D-Bindungsprotein.

Fig. 3 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven, nicht-radioaktiven ELISA-Verfahrens, wobei das Vitamin-D-Bindungsprotein zunächst über anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörper an die feste Phase gebunden wird. Danach

erfolgt in flüssiger Phase die kompetitive Bindung von 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Biotin und 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ aus Standard bzw. Probe. Zur Bestimmung wird dann Peroxidase-markiertes Streptavidin eingesetzt.

5

Fig. 4 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven ELISA-Versuchs, wobei das Vitamin-D-Bindungsprotein direkt an die feste Phase gebunden ist. Die kompetitive Bindung von 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Biotin und 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ aus Standard bzw. Probe in flüssiger Phase erfolgt und Peroxidase-markiertes Streptavidin zur Bestimmung eingesetzt wird;

Figur 5 zeigt die Eichkurve eines erfindungsgemäßen kompetitiven, nicht-radioaktiven ELISA-Verfahrens. Die Ordinate gibt die optische Dichte bei 450 nm an; die Abszisse die Konzentration 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ in nmol/l. Für diese Eichkurve wurden Vitamin-D₃-Proben mit Konzentrationen von 0, 8, 20, 50, 125 und 312 nmol/l hergestellt. Es wurde jeweils die optische Dichte dieser Proben im Doppel bei 450 nm gemessen. Aus den Mittelwerten der Doppelbestimmungen wurde eine Eichkurve erstellt.

Fig. 6 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven Protein-Bindungsversuch (CPBA), wobei 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Biotin und 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ aus Standard bzw. Probe in flüssiger Phase um die Bindungsstelle des Vitamin-D-Bindungsproteins kompetitieren. Es wird ¹²⁵I-markiertes Streptavidin für die Bestimmung verwendet.

30

Fig. 7 ist die Schemadarstellung eines kompetitiven Radioimmunoassays (RIA), wobei 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Biotin und 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ aus Standard bzw. Probe in flüssiger Phase um die Bindungsstelle eines anti-Vitamin-D-Antikörpers kompetitieren. ¹²⁵I-markiertes Streptavidin wird zur Bestimmung eingesetzt.

35

Fig. 8 zeigt die Schemadarstellung eines 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-IRMA-Versuchs. Es wird zunächst 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Biotin über Streptavidin an die feste Phase gebunden. Die kompetitive Bindung von Vitamin-D-Bindungsprotein an das Konjugat und 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ aus Standard oder Probe erfolgt dann in flüssiger Phase. Die Menge des Konjugat-gebundenen Bindungsproteins wird mit ¹²⁵I-markierten Antikörpern bestimmt.

Fig. 9 ist die Schemadarstellung eines kompetitiven IRMA-Versuchs. Hierzu werden anti-Vitamin-D₃-Antikörper an die feste Phase gekoppelt. An diese binden dann Vitamin-D-Bindungsproteine. Die Kompetition erfolgt im nächsten Schritt zwischen dem 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Konjugat und 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ aus Standard oder Probe. Die Bestimmung der Menge gebundenen Konjugat erfolgte durch ¹²⁵I-markiertes Streptavidin.

Fig. 10 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven IRMA-Versuchs. Es wird zunächst Vitamin-D₃-Bindungsprotein an die feste Phase gekoppelt. Dann erfolgt daran die kompetitive Bindung zwischen dem 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Konjugat und 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ aus Standard oder Probe. Die Menge gebundenen Konjugat wird durch ¹²⁵I-markiertes Streptavidin bestimmt.

Fig. 11 zeigt die Schemadarstellung eines kompetitiven, nicht-radioaktiven ELISA-Verfahrens unter Verwendung von Mikropartikeln. Hierbei wird zunächst 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Biotin über Streptavidin an Mikropartikel gebunden. Dann wird 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Derivat daran gebunden. In flüssiger Phase wird Vitamin-D-Bindungsprotein und die jeweilige Probe zugegeben. Bindungsproteine und 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ aus Standard oder Probe kompetitieren um die Bindungsstelle des Konjugats. Die gebundenen Bestandteile werden dadurch abgetrennt, dass sie über die Mikropartikel von einem Magneten zurückgehalten werden, während der Über-

stand mit den ungebundenen Substanzen entfernt wird. Die Menge gekoppeltes Bindungsprotein wird in einem zweistufigen Verfahren mit einem primären Antikörper gegen Vitamin-D-Bindungsprotein und einem sekundären Peroxidase-markierten Antikörper.

Fig. 12 ist die Schemadarstellung eines kompetitiven, nicht-radioaktiven ELISA-Verfahrens unter Verwendung von Mikropartikeln. Es wird zuerst 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Biotin über Streptavidin an Mikropartikel gebunden. Dann wird die flüssige Probe mit 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ (aus Standard-oder Probe) dazugegeben sowie eine nicht-sättigende Menge Antikörper. Das Konjugat und das native Vitamin-D₃ kompetitieren um die Bindung des Antikörpers. Die Menge gebundener Antikörper erfolgt durch Agglutination der Mikropartikel.

Die bekannten Bestimmungsverfahren für Proteine wie der kompetitive ELISA beruhen auf dem Prinzip, dass die nachzuweisende Verbindung mit einem Bindungsprotein oder Konjugat um eine Bindungsstelle kompetitiert. Es wird dann die Menge gebundenes Bindungsprotein oder Konjugat bestimmt und anhand einer Eichkurve die Konzentration der nachzuweisenden Verbindung ermittelt.

Das erfindungsgemäße Nachweisverfahren erfordert neben dem Bindungsprotein ein zweites Konjugat mit zwei Epitopen. Dieses Konjugat kann entweder die Bindungsstelle bereitstellen oder mit der nachzuweisenden Verbindung um die Bindungsstelle kompetitieren.

Die Stellung der zwei Epitope zueinander hat einen wesentlichen Einfluss auf die Wirksamkeit des Konjugats. Die Konformation und die Zugänglichkeit des Epitops darf nicht durch die Bindung des Bindungsproteins an das erste Epitop verändert werden.

Im Vergleich zu anderen Molekülen, deren Konzentration üblicherweise im ELISA bestimmt wird, bspw. Proteine, sind die natürlichen 25-Hydroxy- und 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃-Metabolite relativ klein. Bei der Herstellung bifunktionaler Konjugate davon liegt die Schwierigkeit darin, dass beide Epitope unabhängig voneinander zugänglich sein müssen.

Bei dem erfindungsgemäßen Konjugat liegen die zwei Epitope, die natürliche Bindungsstelle des Vitamin-D₃-Bindungsproteins und das künstliche Biotin-Epitop, räumlich weit auseinander an den entgegengesetzten Enden des Moleküls. Dies erreicht man, indem man das Biotinmolekül über einen geeigneten langen Spacer an das 25-OH-Gruppe des Vitamin-D₃-Konjugats bindet.

Die Länge des Spacers ist dabei wesentlich. Während zu kurze Spacer nicht den notwendigen Abstand zum Molekül bereitstellen, so dass das künstliche Epitop auch nach einer Besetzung des ersten Epitops aus der Struktur herausragt und frei zugänglich ist, neigen zu lange Spacer dazu sich zu den hydrophoben Bereichen des Vitamin-D₃-Moleküls zurückzufalten. In beiden Fällen verliert das zweite künstliche Epitop seine exponierte Stellung und wird schlecht zugänglich oder nicht erreichbar für weitere Reaktionspartner.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass das erfindungsgemäße bifunktionelle Konjugat wirksam im ELISA eingesetzt werden kann. Bei kleinen Molekülen wie Vitamin-D waren ELISA-Nachweisverfahren bislang nicht erfolgreich. Dies wurde auf das zwei Taschen-Prinzip zurückgeführt, wonach durch die Bindung eines ersten Bindungspartners an das Konjugat das zweite Epitop unzugänglich wird durch sterische Hinderung oder Konformationsänderungen.

Ein weiteres Problem bei der Entwicklung von Bestimmungsverfahren für kleine Haptene oder Steroide liegt in der

Immobilisation auf dem Trägermaterial. Die meisten dieser Moleküle adsorbieren nur relativ schwach oder gar nicht an übliche Träger und müssen daher kovalent an diese gekoppelt werden. Eine kovalente Kopplung birgt jedoch die Gefahr, dass die Bindungseigenschaften des Moleküls beeinflusst werden oder ein Epitop nicht in nativer Weise exponiert wird. Dadurch kann es zu ungenauen oder falschen Messergebnissen kommen.

Das erfindungsgemäße 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Derivat der Formel II löst dieses Problem, indem es indirekt, bspw. über Streptavidin oder das Vitamin-D-Bindungsprotein, an den Träger gebunden werden kann. Durch die zwei beabstandeten Epitope kann das erfindungsgemäße Derivat vielseitig eingesetzt werden.

Es wurde gefunden, dass der Säurerest der Biotingruppe nicht zur Beabstandung der Moleküle ausreicht. Aus Röntgenstrukturanalysen der Biotin/Streptavidin-Bindung ist bekannt, dass das Biotinmolekül mit den Aromatenringen in einer Tasche im Inneren des Streptavidinmoleküls steckt. Der Säurerest des Biotinmoleküls ragt zwar aus dem Streptavidin heraus, liegt jedoch eng auf der Oberfläche. Er steht daher nicht als Abstandsgruppe (Spacer) zur Verfügung.

Die erfindungsgemäße Verbindung hat den unmittelbarer Vorteil, dass der Spacer die zwei Epitope des bifunktionellen Konjugats in einem definierten Abstand zueinander hält. So sind beide Epitope unabhängig voneinander für eine Bindung zugänglich.

BEISPIELE

Die Reaktionsschritte zur Herstellung des Vitamin-D₃-Konjugats erfolgten alle in einer trockenen N₂-Atmosphäre, wobei die Reaktionsgefäße mit Aluminiumfolie umwickelt waren. Die

Zwischenprodukte wurden bei -20°C gelagert. Als Lösungsmittel wurden ausschließlich HPLC-Lösungsmittel eingesetzt. Alle allgemeinen Chemikalien wurden von Fluka bezogen; das 25-OH Vitamin-D₃ stammte von Immundiagnostik und der LC-BHNS (Long Chain Biotinyl-N- ϵ -aminocaproyl-hydroxysuccinimide-ester) von Boehringer Mannheim. Die MS(FAB)-Analysen erfolgten mit einem Finigan-MAT-90 und NMR-Messungen mit einem Bruker-ARX-400 (400 MHz) sowie einem Bruker-ARC-250F (250 MHz).

Beispiel 1

Herstellung von 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3 β -3' [6-N-(biotinyl)-hexamido]amidopropylether

1.1 Herstellung von 25-Hydroxyvitamin-D₃3 β -cyanoethylether (1)

Stammlösungen:

a) Acrylnitrilmischung: 86 μl Acrylnitril (1.3 mMol) wurden mit Acetonitril auf 1 ml aufgefüllt (100 μl dieser Lösung entsprachen 130 μMol Acrylnitril, 10 eq.).

b) KH-Lösung: 10 mg KH (250 μMol) wurden in 1 ml einer t-BuOH/Acetonitril-Mischung (9:1 v/v) gelöst (25 μl davon entsprachen 6.25 μMol KH, 0.5 eq.).

Es wurden 5 mg 25-OH D₃ (12,5 μMol), gelöst in CH₂Cl₂, in N₂-Kolben überführt und das CH₂Cl₂ abgezogen. Der Rückstand wurde mit 1 ml Acetonitril aufgenommen und mit 10 Tropfen einer t-BuOH/Acetonitril-Mischung (9:1 v/v) und 100 μl der o.g. Acrylnitrilmischung versetzt. Die klare Lösung wurde 15 min bei 6 $^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wurden 25 μl der o.g. KH-Lösung zugegeben. Die dabei entstehende Ausflockung löste sich sofort wieder auf. Die Mischung wurde bei 6 $^{\circ}\text{C}$

weitergerührt. Eine Dünnschichtchromatographie (DC) mit 20% Petrolether in MTBE (Methyl-t-Butylether) zeigte nach 10 Minuten eine 90%ige Umsetzung. Nach 15 Minuten wurde ein kleiner Teil (wenige Tropfen) des Reaktionsgemischs probe-
 5 weise mit etwa 5 Tropfen Wasser und 0.5 ml MTBE aufgearbei-
 tet. Eine DC der organischen Phase zeigte kein Edukt mehr. Nach 40 Minuten wurde das gesamte Reaktionsgemisch mit Wasser/MTBE aufgearbeitet. Es wurden 4 mg eines Öls gewon-
 nen.

10

IR (NaCl/CH ₂ Cl ₂):	3422,	OH
	2941, 2872	CH
	2252	Nitril
	1105	Ether

15

Die HPLC Analyse (3% MeOH/CH₂Cl₂) zeigte ein Produkt/Edukt-Verhältnis von 13:1, was 93% Produkt und 7% Edukt ent-
 spricht. Die erhaltenen 4 mg enthalten somit 3.7 mg (8,2
 µMol) Produkt. Dies entspricht einer Ausbeute von 74%.

20

1.2 Herstellung von 25-Hydroxyvitamin-D₃-3β-3'aminopropyl- ether (3)

Stammlösungen:

25

a) LiH-Lösung: 7 mg frisches feinpulvriges LiH wurden unter N₂ in 7 ml Ether aufgenommen (1 ml = 125 µMol).

30

b) LiAlH₄-Lösung: 18 mg frisches feinpulvriges LiAlH₄ wurden unter N₂ in 3 ml Ether aufgeschlämmt (1 ml = 169 µMol).

35

Das Produkt aus Beispiel 1.1, umfassend 3.75 mg (8.3 µMol) Nitril, wurde in 2 ml Ether gelöst, mit 1 ml (125 µMol) der LiH-Lösung versetzt und unter N₂ 1 Std. bei RT gerührt. Dann wurde 1 ml (170 µMol) der LiAlH₄-Lösung zugegeben. Nach einer weiteren Stunde wurde das Gemisch mit 1 ml konzen-

triertem KOH, 5 ml H₂O und 4 x 20 ml MTBE aufgearbeitet. Die DC (Kieselgel, 1:1 MTBE/Betrolether) zeigte nur noch den Ausgangspunkt und das Diol lag bei R_f 0.27; das Nitril bei R_f 0.4.

5

Die gewonnene Substanz wurde ohne weitere Analyse und Reinigung weiterverarbeitet.

1.3 Herstellung von 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3 β -3' [6-N-(biotinyl)-hexamido]amidopropylether (4)

10

Es wurden 3 mg (6.6 μ Mol) 25-OH D₃-3-aminopropylether (3) aus Beispiel 1.2 in 1 ml DMF gelöst. Dann wurden unter Stickstoff 3 mg (6.6 μ Mol) LC-BNHS und 1 μ l (17.5 μ Mol) Et₃N zugegeben. Es wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt, das DMF abgezogen und der Rückstand mit 20% MeOH in CH₂Cl₂ vorgereinigt. 12 mg (> 100%) der so gewonnenen Substanz wurden dann mittels HPLC gereinigt (Knauer Kromasil-100, 5 μ M, 250 x 4 mm), 10% MeOH in CH₂Cl₂, 1,5 ml/min, 265 nm, 7 Minuten. Die Ausbeute betrug 1.2 mg (1.5 μ Mol). Dies entspricht 12%, bezogen auf das 25-OH D₃ bzw. 18%, bezogen auf die Nitrilverbindung.

15

20

MS (Finigan MAT 90)

25

(FAB): 797 (MH⁺) vom 5.9.97 und 28.11.97

¹ H-NMR (Bruker ARX 400) in CDCl₃/TMS bei 400 MHz.

Die Analysedaten sind in nachstehender Tabelle gezeigt.

30

35

Tabelle I

5

10

15

20

25-OH-D ₃ -Bio-Verbindung (4)				
δ	H	Mult	cc [Hz]	Zuordnung
6,42	1	dd	5,7	NH (Biotin)
6,2	1	d	11	6
6,0	1	d	11	7
5,85	1	dd	5,7	NH (Biotin)
5,55	2	m		3-O-CH ₂ (28)
5,38	1	s		NH oder OH
5,05	1	d	2	19
4,83	1	d	2	19
4,77	1	s		NH oder OH
4,51	1	m		HC-NH I Biotin
4,33	1	m		HC-NH II Biotin
3,53	1	m		3
2,53	1	d	10	4
1,21	6	s		26, 27-CH ₃
0,93	3	d	6	21-CH ₃
0,54	3	s		18-CH ₃

1.4 Stabilitätstest

25 Es wurden 20 mg der gereinigten 25-OH-D₃-Biotin-Verbindung aus Beispiel 1.3 (25-Hydroxy-Vitamin-D₃-3 β -3' [6-N-(biotinyl)-hexamido]amidopropylether) in NMR-Röhrchen gegeben und mit 1 ml Lösungsmittel gelöst. Das Lösungsmittel war eine Mischung aus Deuteriochloroform:Deuterioacetonitril:D₂O

im Verhältnis 3:2:1 mit einem pH-Wert zwischen 4 und 5. Die Proben wurden 200 Tage gelagert, wobei in regelmäßigen Abständen die NMR-Spektren untersucht wurde. Die Proben wurden unter folgenden Bedingungen gelagert:

5

Probe 1: unter Lichtausschluss bei - 20°C;

Probe 2: unter Lichtausschluss bei + 4-6°C;

Probe 3: unter Lichtausschluss bei Umgebungstemperatur;

10

Probe 4: bei Umgebungstemperatur und unter starker Lichteinwirkung (auf der Fensterbank).

15

Die Proben 1 und 2 zeigten während der ganzen Zeit keine wesentliche Veränderung im NMR-Spektrum. Eine HPLC-Analyse bestätigte, dass die Proben 1 und 2 auch nach 200 Tagen in protischem Lösungsmittel intakt waren. Probe 3 zeigte eine minimale Veränderung im NMR-Spektrum nach 100 Tagen. Die HPLC-Analyse ergab, dass mehr als 78% der Verbindung noch intakt war. Probe 4 war nach 2 Monaten abgebaut.

20

Die Stabilitätsuntersuchung zeigt, dass die Verbindung unter Ausschluss von Licht sehr beständig ist, selbst in protischem Lösungsmittel und ohne Kühlung.

25

Beispiel 2

25(OH)Vitamin-D₃-ELISA (Standardprotokoll)

Puffer:

30

a) Waschpuffer:

PBS, pH 7.4 mit 0.05% Tween-20

b) Assaypuffer:

35

5 g Casein wurden in 100 ml 0.1 N NaOH gelöst und mit PBS, pH 7,4 auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung wurde 1 Std. gekocht. Dann wurde mit destillierten Wasser auf

1 l aufgefüllt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.
Zuletzt wurden 0,1 g Thimerosal hinzugefügt.

Alle Inkubationen erfolgten im Dunkeln und unter Schütteln.

5

1) Beschichtung der Mikrotiterplatte

In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 ng Streptavidin, gelöst in 60 mM Carbonat pH 9,6, gegeben und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde dann ausgeschlagen und jede Vertiefung 5-mal mit jeweils 200 µl Waschpuffer gewaschen. Dann wurden 250 µl Assaypuffer in jede Vertiefung gegeben und die Platte 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde danach wieder ausgeschlagen und jede Vertiefung 5-mal mit jeweils 200 µl Waschpuffer gewaschen.

2) Probenvorbereitung

Es wurden 50 µl Serum, Plasma oder Standard in einem 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200 µl Ethanol_{abs} (vorgekühlt auf -20°C) durch Vortexen gemischt und 20 Minuten bei -20°C ausgefällt. Die Proben wurden anschließend in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und im ELISA eingesetzt.

3) ELISA

1. Schritt: es wurden in jede Vertiefung 100 µl einer Biotin-Vitamin-D₃-Lösung gegeben (10 ng Biotin-Vitamin-D₃/ Vertiefung, gelöst in Waschpuffer) und 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte ausgeschlagen und jede Vertiefung 5-mal mit jeweils 200 µl Waschpuffer gewaschen.

35

2. Schritt: es wurden jeweils 100 µl Vitamin-D-Bindungsprotein (1:15.000 in Assaypuffer + 3% (w/v) PEG 6000) und

10 μ l Standard, Kontrolle oder Probe (10 μ l des Überstands
aus der Probenvorbereitung) in die Vertiefungen gegeben.
Die Platte wurde 24 Std. bei 4°C inkubiert. Dann wurde die
Platte ausgeschlagen und jede Vertiefung 5-mal mit jeweils
5 200 μ l Waschpuffer gewaschen.

3. Schritt: es wurden jeweils 100 μ l Kaninchen-anti-Vita-
min-D-Bindungsprotein (1:10.000 verdünnt in Assaypuffer +
3% (w/v) PEG 6000) in die Vertiefungen gegeben und 1 Std.
10 bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde danach aus-
geschlagen und jede Vertiefung 5-mal mit jeweils 200 μ l
Waschpuffer gewaschen.

4. Schritt: es wurden jeweils 100 μ l anti-Kaninchen-IgG-
15 Peroxidase (1:20.000 verdünnt in Dr. Berg-Rot) in die Ver-
tiefungen gegeben und 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert.
Dann wurde die Platte ausgeschlagen und jede Vertiefung 5-
mal mit jeweils 200 μ l Waschpuffer gewaschen.

20 5. Schritt: für die Farbreaktion wurden 100 μ l TMB-Sub-
strat-Lösung in jede Vertiefung gegeben. Nach ausreichender
Farbentwicklung wurde die Reaktion mit 50 μ l 2 M H₂SO₄ pro
Vertiefung beendet. Die Messung der optischen Dichte er-
folgte bei 450 nm.

25

Beispiel 3

Es wurde die Vitamin-D₃-Konzentration verschiedener Proben
nach dem Protokoll aus Beispiel 2 gemessen. Als Vergleich
30 wurde die Vitamin-D₃-Konzentration der Proben durch HPLC
bestimmt. Für die Eichkurve wurden Plasma-Standards verwen-
det mit Vitamin-D₃-Konzentrationen von 0, 8, 20, 50, 125 und
312 nmol/l. Alle Proben und Standards wurden im Doppel be-
stimmt. Die Vitamin-D₃-Konzentration der Proben wurden dann
35 anhand der Eichkurve aus dem Mittelwert der Doppelbestim-
mung berechnet.

Die Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle II gezeigt.

Tabelle II

Probe	25(OH)-Vitamin-D ₃ [nmol/l]	
	HPLC	erfindungsgemäßer ELISA
1	20-33	30
2	72-120	76
3	79-102	96
4	< 15	< Nachweisgrenze
5	< 15	7,4

Beispiel 4

25(OH) Vitamin-D₃-ELISA-MTP mit anti-Vitamin-D-Bindungsprotein beschichtet (nach dem Standardprotokoll)

Puffer:

a) Waschpuffer:

PBS, pH 7.4 mit 0.05% Tween-20

b) Assaypuffer:

5 g Casein wurden in 100 ml 0.1 N NaOH gelöst und mit PBS, pH 7,4 auf 1 l aufgefüllt. Dann wurden 3% (w/v) PEG-6000 sowie 0.1 g Thimerosal hinzugefügt.

Alle Inkubationen erfolgten im Dunkeln und unter Schütteln.

1) Beschichtung der Mikrotiterplatte

In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 μ l Kaninchen-anti-Vitamin-D-Bindungsprotein in 60 mM NaHCO₃, pH 9,6 gegeben und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde dann ausgeschlagen und jede Vertiefung 5-mal mit jeweils 200 μ l Waschpuffer gewaschen. Dann wurden 250 μ l Assaypuffer in jede Vertiefung gegeben und die Platte 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde danach wieder ausgeschlagen und jede Vertiefung 5-mal mit jeweils 200 μ l Waschpuffer gewaschen.

10

2) Probenvorbereitung

Es wurden 50 μ l Serum, Plasma oder Standard in einem 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200 μ l Ethanol_{abs} (vorgekühlt auf -20°C) gemischt und gevortext und dann 20 min bei -20°C ausgefällt. Die Proben wurden anschließend in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und im ELISA eingesetzt.

15

20 3) ELISA

1. Schritt: es wurden in jede Vertiefung 100 μ l Vitamin-D-Bindungsprotein, verdünnt in Assaypuffer, gegeben und 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte ausgeschlagen und jede Vertiefung 5-mal mit jeweils 200 μ l Waschpuffer gewaschen.

25

2. Schritt: es wurden jeweils 100 μ l Biotin-Vitamin-D, verdünnt in Assaypuffer, in die Vertiefungen gegeben. Die Platte wurde dann 3 Std. bei Raumtemperatur oder 24 Std. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte ausgeschlagen und jede Vertiefung 5-mal mit jeweils 200 μ l Waschpuffer gewaschen.

30

3. Schritt: es wurden jeweils 100 μ l Streptavidin-POX einer 1:10000-Verdünnung in Dr. Berg Rot in die Vertiefungen gegeben und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die

35

Platte wurde danach ausgeschlagen und jede Vertiefung 5-mal mit jeweils 200 μ l Waschpuffer gewaschen.

4. Schritt: für die Farbreaktion wurden 100 μ l TMB-Sub-
 5 strat-Lösung in jede Vertiefung gegeben. Nach ausreichender
 Farbentwicklung wurde die Reaktion mit 50 μ l 2M H_2SO_4 pro
 Vertiefung beendet. Die Messung der optischen Dichte er-
 folgte bei 450 nm.

10 Beispiel 5

..."Konkretes Beispiel zum Versuch aus Beispiel 4"...

15 Beispiel 6

Versuchsbeschreibung kompetitiver Protein-Bindungsassay in
 flüssiger Phase (Schema I des RIA-Verfahrens)
 "Möglichst ein konkretes Beispiel"....

20 Beispiel 7

Versuchsbeschreibung kompetitiver Radioimmunoassay (RIA) in
 flüssiger Phase (Schema II des RIA-Verfahrens)
 25 "Möglichst ein konkretes Beispiel".....

Beispiel 8

Versuchsbeschreibung kompetitiver IRMA (Schema I des IRMA-
 30 Verfahrens)
 "Möglichst ein konkretes Beispiel".....

Beispiel 9

35 Versuchsbeschreibung kompetitiver IRMA (Schema II des IRMA-
 Verfahrens)
 "Möglichst ein konkretes Beispiel".....

23 11.23.00.99

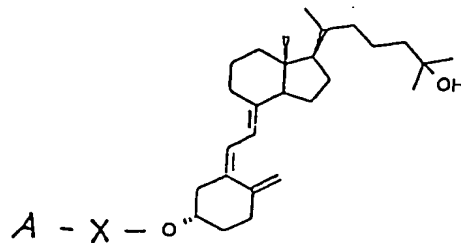
Beispiel 10

Versuchsbeschreibung kompetitiver IRMA (Schema III des
IRMA-Verfahrens)

5 "Möglichst ein konkretes Beispiel".....

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Multifunktionelles 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Derivat der
allgemeinen Formel I:



wobei X eine Abstandsgruppe ist, die eine Länge von 12 bis 42 Å hat und über eine Etherbindung mit der 25-OH-Gruppe des Vitamin-D₃-Moleküls verbunden ist, und A eine Gruppe ist, die von spezifischen Antikörpern mit hoher Affinität gebunden wird.

2. 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Derivat nach Anspruch 1, wobei A eine Biotingruppe ist.
3. 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Derivat nach Anspruch 1 und 2, wobei die Abstandsgruppe eine Länge von 8 bis 12 Å hat.
4. 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Derivat nach Anspruch 1 bis 3, wobei die Abstandsgruppe ein Aminocarbonsäure-, ein Aminoundecansäure- oder ein Aminopolyetherrest ist.
5. Verfahren zur Herstellung des 25-Hydroxy-Vitamin-D₃-Derivats nach Anspruch 1, umfassend die Schritte:
- a) Cyanoethylierung von 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ mit Acrylnitril in Gegenwart von Kaliumhydrid;
 - b) Reduktion der Nitrilgruppe mit LiH/LiAlH₄;
 - c) Biotinylierung der Verbindung mit dem aktivierten Biotinylierungsreagenz (LC-BHNS).

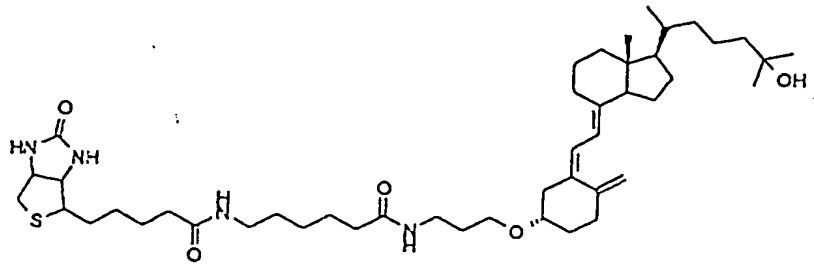
6. Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1,25-Di-hydroxy-Vitamin-D₃-Metaboliten in einer Probe, wobei das Vitamin-D₃-Derivat aus Anspruch 1 verwendet wird.
- 5 7. Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1,25-Di-hydroxy-Vitamin-D₃-Metaboliten nach Anspruch 6, wobei das Verfahren ein kompetitiver ELISA, RIA oder IRMA ist.
- 10 8. Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1,25-Di-hydroxy-Vitamin-D₃-Derivaten nach Anspruch 6 und 7, umfassend die Schritte:
 - a) Beschichten des Trägers mit Streptavidin;
 - b) Zugabe der Biotin-Vitamin-D₃-Derivate;
 - 15 c) Zugabe der Probe und einer definierten Menge Vitamin-D₃-Bindungsprotein;
 - d) Bestimmung des gebundenen Bindungsproteins mit markierten anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörpern.
- 20 9. Verfahren zur Bestimmung nach Anspruch 8, wobei die anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörper mit Peroxi-dase markiert sind.
- 25 10. Verfahren zur Bestimmung von 25-Hydroxy- und 1,25-Di-hydroxy-Vitamin-D₃-Derivaten nach Anspruch 6 und 7, umfassend die Schritte:
 - a) Beschichten des Trägers mit anti-Vitamin-D-Bindungsprotein-Antikörpern;
 - b) Zugabe des Vitamin-D₃-Bindungsproteins;
 - 30 c) Zugabe der Probe sowie eine definierte Menge Biotin-Vitamin-D₃-Derivat;
 - d) Bestimmung der Menge gebundenes Derivat mit markiertem Streptavidin.
- 35 11. Verfahren zur Bestimmung nach Anspruch 10, wobei das Streptavidin mit Peroxidase markiert ist.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 11, wobei der Träger eine Mikrotiterplatte ist oder aus magnetischen Mikropartikeln besteht.

5 13. Testkit zur Bestimmung von 25-Hydroxy-Vitamin-D₃ in einer Probe, umfassend:

eine beschichtete Mikrotiterplatte,
ein biotinyliertes Vitamin-D₃-Derivat der Formel:

10



15

Vitamin-D₃-Bindungsprotein,
anti-Vitamin-D₃-Antikörper,
Streptavidin, und.....

20 13. Testkit nach Anspruch 12, umfassend Mikropartikel als Trägermaterial.

(1) $C_{27}H_{44}O_2$
 400.6

(2) $C_{30}H_{47}NO_2$
 452.8

(3) $C_{30}H_{51}NO_2$
 458

(4) $C_{48}H_{76}N_4O_{35}S$
 756

LC-BHNS:
 12% bezgl. (1)
 13% bezgl. (2)

Fig. 2

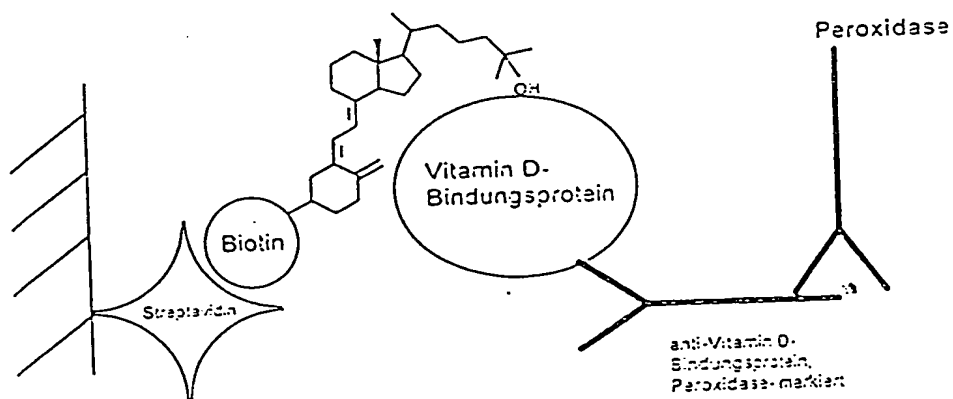


Fig. 3

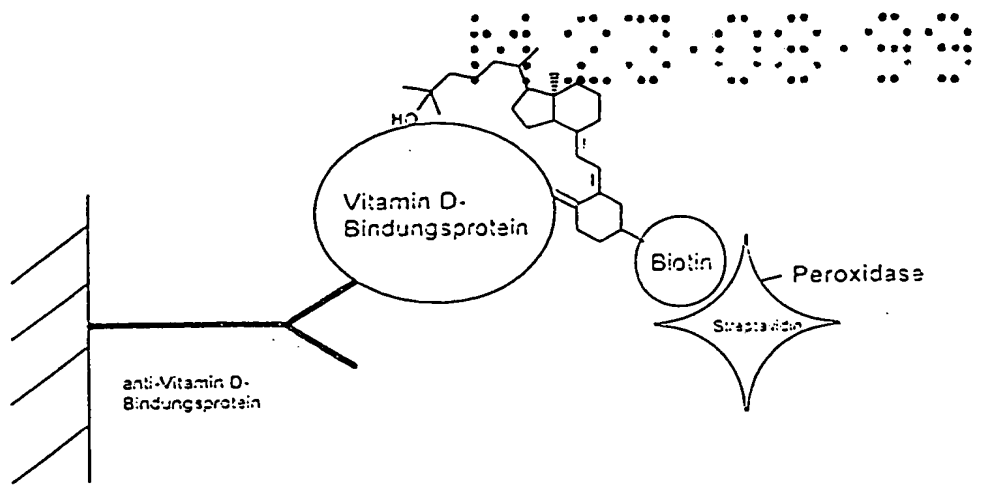


Fig. 4

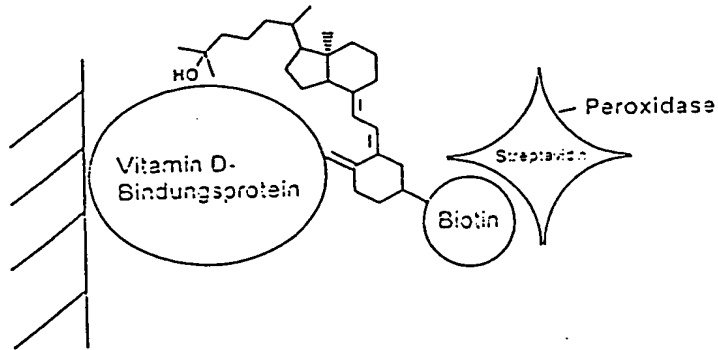
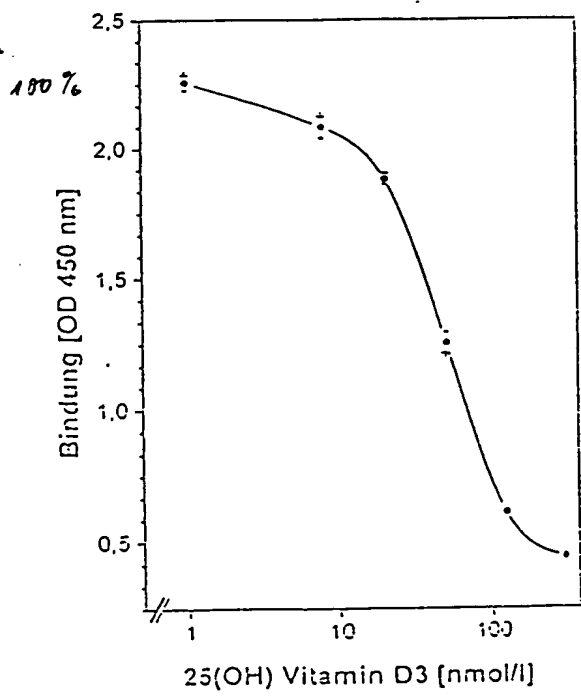


Fig. 5



Tetramethylbenzidin

Ortho phenyl

M 23.08.99

Fig. 6

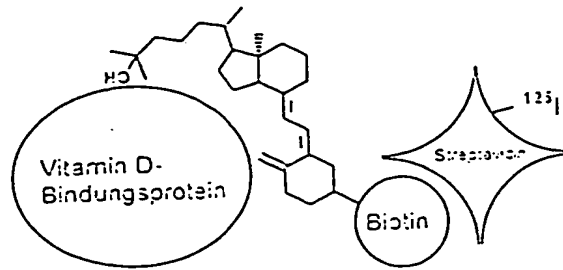


Fig. 17

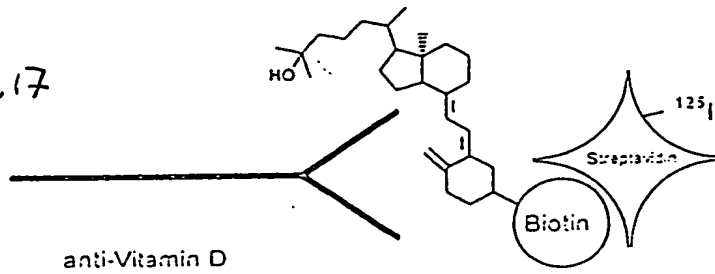


Fig. 8

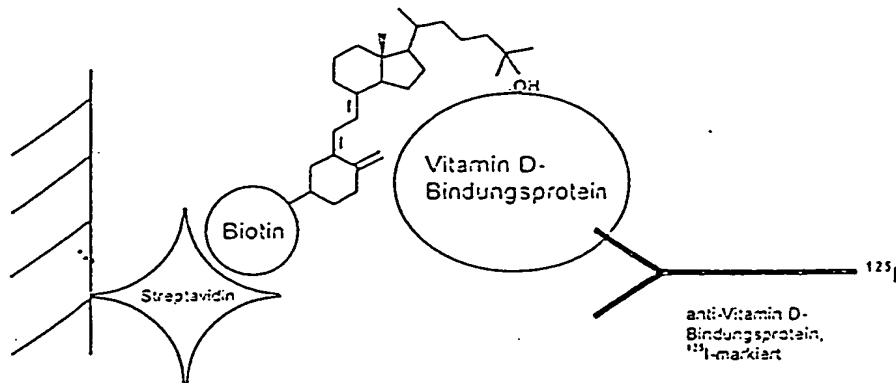
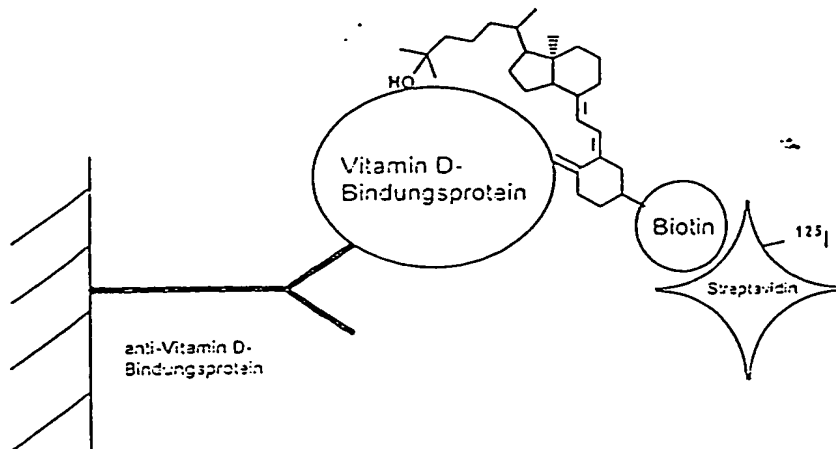


Fig. 9



14 03 00 99

Fig. 10

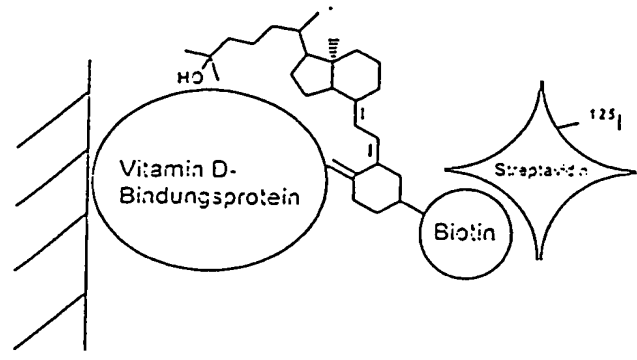


Fig. 14

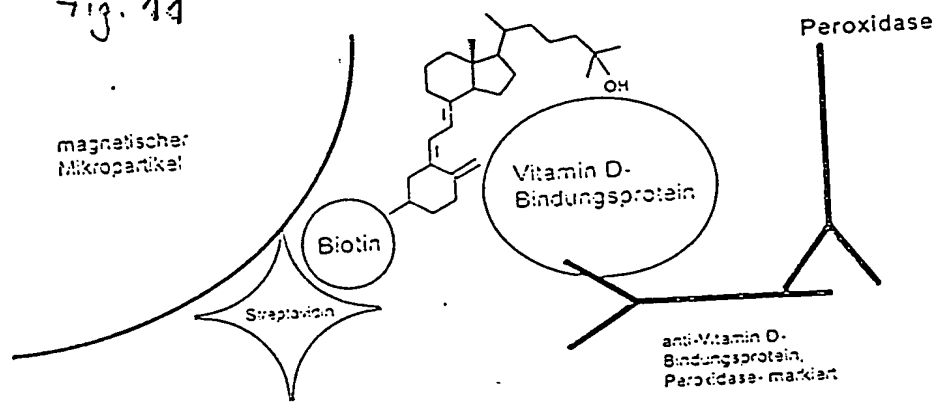
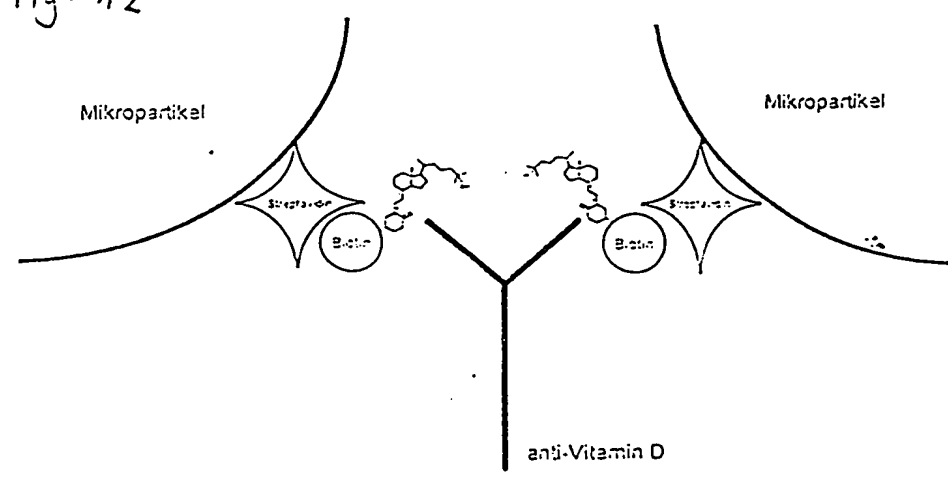


Fig. 12



THIS PAGE BLANK (USPTO)